

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/87, 15/86, 7/04, A61K 48/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/24299
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	27. Oktober 1994 (27.10.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/01065		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. April 1994 (06.04.94)			
(30) Prioritätsdaten: P 43 11 651.5 8. April 1993 (08.04.93)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE). GENENTECH, INC. [US/US]; 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): COTTEN, Mathew [US/AT]; Maxingstrasse 22-24/3/8, A-1130 Wien (AT). WAGNER, Ernst [AT/AT]; Wiener Strasse 201, A-2103 Langenzersdorf (AT).			
(74) Anwalt: LAUDIEN, Dieter; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			

(54) Title: ADENOVIRUS FOR THE TRANSFER OF FOREIGN DNA INTO HIGHER EUKARYOTIC CELLS

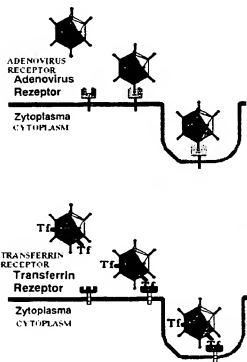
(54) Bezeichnung: ADENOVIRUS FÜR DEN TRANSPORT VON FREMD-DNA IN HÖHERE EUKARIOTISCHE ZELLEN

(57) Abstract

Described is an adenovirus whose surface has been modified with transferrin for the introduction of foreign DNA into higher eucaryotic cells, bonding preferably being through the glycoprotein part of the transferrin. The foreign DNA is imported into cells which have no adenovirus receptors and expressed. The adenovirus may be recombinant or non-recombinant.

(57) Zusammenfassung

Adenovirus für den Transport von Fremd-DNA in höhere eukaryotische Zellen, dessen Oberfläche mit Transferrin modifiziert ist, wobei die Bindung bevorzugt über den Glycoproteinanteil des Transferrins erfolgt. Die Fremd-DNA wird in Zellen, die keine Adenovirusrezeptoren aufweisen, importiert und exprimiert. Das Adenovirus ist rekombinant oder nicht-rekombinant.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT Österreich	GA Gabon	MR Mauretanien
AU Australien	GB Vereinigtes Königreich	MW Malawi
BB Barbados	GE Georgien	NE Niger
BE Belgien	GN Guinea	NL Niederlande
BF Burkina Faso	GR Griechenland	NO Norwegen
BG Bulgarien	HU Ungarn	NZ Neuseeland
BJ Benin	IE Irland	PL Polen
BR Brasilien	IT Italien	PT Portugal
BY Belarus	JP Japan	RO Rumänien
CA Kanada	KE Kenia	RU Russische Föderation
CF Zentrale Afrikanische Republik	KG Kirgisistan	SD Sudan
CG Kongo	KP Demokratische Volksrepublik Korea	SE Schweden
CH Schweiz	KR Republik Korea	SI Slowenien
CI Côte d'Ivoire	KZ Kasachstan	SK Slowakei
CM Kamerun	LI Liechtenstein	SN Senegal
CN China	LK Sri Lanka	TD Tschad
CS Tschechoslowakei	LU Luxemburg	TG Togo
CZ Tschechische Republik	LV Letland	TJ Tadschikistan
DE Deutschland	MC Monaco	TT Trinidad und Tobago
DK Dänemark	MD Republik Moldau	UA Ukraine
ES Spanien	MG Madagaskar	US Vereinigte Staaten von Amerika
FI Finnland	ML Mali	UZ Usbekistan
FR Frankreich	MN Mongolei	VN Vietnam

ADENOVIRUS FÜR DEN TRANSPORT VON FREMD-DNA IN HÖHERE EUKARIOTISCHE ZELLEN.

Die Erfindung bezieht sich auf das Einbringen von Nukleinsäuren in höhere eukaryotische Zellen.

Bedarf an einem effizienten System für das Einführen von Nukleinsäure in lebende Zellen besteht vor allem im Rahmen der Gentherapie. Dabei werden Gene in Zellen eingeschleust, um in vivo die Synthese therapeutisch wirksamer Genprodukte zu erzielen, z.B. um im Falle eines genetischen Defekts das fehlende Gen zu ersetzen.

Für den Transfer von Genen in die Zellen werden z.B. virale Vektoren eingesetzt, die sich der effizienten Eintrittsmechanismen ihrer Ausgangsviren bedienen. Darunter werden Viren verstanden, in deren Genom das in der Zelle zu exprimierende Gen mittels rekombinanter Methoden integriert wurde. Diese Strategie wurde bei der Konstruktion rekombinanter retroviraler und adenoviraler Vektoren angewendet, um einen hoch wirksamen Gentransfer in vitro und in vivo zu erzielen. Die bisher am weitesten fortgeschrittenen Technologien für die Anwendung von Nukleinsäuren im Rahmen der Gentherapie benutzen retrovirale Systeme für den Transfer von Genen in die Zelle (Wilson et al., 1990; Kasid et al., 1990). Es wurden daher bereits Methoden entwickelt, um die Anwendbarkeit der retroviralen Systeme zu erweitern bzw. deren Spezifität für eine definierte Zellpopulation zu ermöglichen, indem z.B. der Tropismus der Viren verändert wurde.

Von Roux et al., 1989, und in der Französischen Patentanmeldung 2 649 119 wurde ein System beschrieben, das den Tropismus von Retroviren mit Hilfe bifunktionaler Konjugate verändert, die auf der einen

2

Seite einen Antikörper gegen die Virushülle und auf der anderen Seite einen spezifischen Zellmembranmarker für die Zielzellen enthalten und somit die Verbindung des Virus mit der Wirtszelle herstellen.

Der von Goud et al., 1988, vorgeschlagene Ansatz beruht ebenfalls auf dem Prinzip bifunktioneller Konjugate. Diese Konjugate sind eine Konstruktion aus zwei monoklonalen Antikörpern, von denen einer gegen den humanen Transferrinrezeptor und einer gegen das gp70 Hüllprotein des Moloney-Retrovirus gerichtet ist. Mit Hilfe dieser Konjugate konnte das Retrovirus zwar in die Zielzellen eindringen, nicht jedoch in diesen replizieren.

Die in der WO 92/06180 beschriebene Methode zur Veränderung des Tropismus eines Virus besteht darin, die Oberfläche eines Virus mit einem Molekül zu versehen, das an einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle bindet, womit das Virus eine - natürlicherweise nicht vorhandene - Spezifität für die Zielzelle erhält. In der WO 92/06180 wird die Modifikation eines Retrovirus und von Hepatitisvirus B mit Kohlenhydratmolekülen beschrieben, die an den Asialoglykoproteinrezeptor binden.

Für die Anwendung im Rahmen der Gentherapie sind in jüngster Zeit an die Stelle rekombinanter Retroviren zunehmend rekombinante Adenoviren getreten (Berkner, 1988; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1992).

Adenovirale Vektoren haben die vorteilhafte Fähigkeit, in nicht-teilende Zellen eindringen und eine DNA-Fremdsequenz im Ausmaß von bis zu 8.5 kb aufnehmen zu

können. Ferner können die Adenoviruspartikel ausgiebig gereinigt werden, ohne an Stabilität einzubüßen, und in Titern höher als 10¹¹PFUs/ml hergestellt werden.

Ein Beschränkung bei der Anwendung der von den Adenoviren Ad2 und Ad5 abgeleiteten rekombinanten Vektoren besteht in ihrer nur geringen Fähigkeit, in Blutzellen einzudringen. Blutzellen sind jedoch ein bevorzugtes Ziel für gentherapeutische Anwendungen, weil sie leicht verfügbar sind und in den Patienten wiedereingeführt werden können, auch sind die Methoden zu ihrer Gewinnung und Kultivierung etabliert. Der Grund für die schwache Aktivität der adenoviralen Vektoren in Blutzellen liegt in der offensichtlich geringen Zahl an Rezeptoren für Adenoviren auf diesen Zellen (Horvath und Weber 1988; Silver und Anderson, 1988). Während die Bindung des Virus an diese Zellen um das Zwei- bis Fünffache reduziert ist, ist die Internalisierung des gebundenen Virus noch wesentlich geringer. Die von vornherein geringe Rezeptorzahl dürfte also mit einer stark verminderten Internalisierung der vorhandenen Rezeptoren einhergehen.

Kürzlich wurde in mehreren Arbeiten der Einsatz von nicht-rekombinanten Adenoviren aufgrund der Fähigkeit von Adenoviren, den Inhalt von Endosomen freisetzen zu können, für den Gentransfer mit DNA-Komplexen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose vorgeschlagen. Der Einsatz von Adenoviren bewirkt eine Steigerung der Effizienz des Gentransfers, indem der Abbau der in die Zelle internalisierten DNA-Komplexe in den Lysosomen vermieden wird (Curiel et al., 1991; Curiel et al., 1992a; Zatloukal et al., 1992; Cotten et al., 1992; Wagner et al., 1992; Curiel et al., 1992b; Yoshimura et al., 1993; WO 93/07283). Es wurde u.a. vorgeschlagen,

die Adenoviren durch Bindung an Polylysin zu modifizieren. Die Adenovirus-Polylysin-Konjugate können zusammen mit Konjugaten aus Transferrin-Polylysin mit DNA komplexiert werden, wobei ternäre Transferrin-Polylysin/Adenovirus-Polylysin/DNA-Komplexe entstehen (Wagner et al., 1992). Im Zuge dieser Arbeit wurde festgestellt, daß K562-Zellen in Gegenwart von freiem Adenovirus bei Transfektion mit Transferrin-Polylysin-Konjugaten nur sehr geringe Expressionsraten des importierten Reportergens zeigten, während Polylysin-gekoppeltes Adenovirus, gemeinsam mit Transferrin-Polylysin unter Bildung eines ternären Komplexes an die Reporter-DNA komplexiert, sehr gute Ergebnisse brachte. Dieses Phänomen ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Internalisierung der DNA-Komplexe in Blutzellen, die eine geringe Zahl an Adenovirusrezeptoren aufweisen, über den Transferrinrezeptor abläuft, über den die Blutzellen in großer Zahl verfügen.

Adenoviren können nicht in Zellen eindringen, die Adenovirusrezeptoren nicht oder in für eine effiziente Internalisierung ungenügender Zahl aufweisen, oder auch, was vor allem bei Anwendungen *in vivo* von Bedeutung ist, aufgrund der Tatsache, daß die Bindungsstellen des Virus, z.B. durch einen Antikörper, blockiert sind.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, Adenoviren mit der Fähigkeit bereitzustellen, in Zellen, in die sie normalerweise nicht eindringen können, effizient unter Beibehaltung ihrer Fähigkeit zur Genexpression und/oder ihrer endosomolytischen Eigenschaften eindringen zu können.

Die Erfindung betrifft somit ein Virus für den Transport von Fremd-DNA in höhere eukaryotische Zellen, dessen Oberfläche mit einem Liganden für einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle derart modifiziert ist, daß es an die Zelle bindet und derart internalisiert wird, daß die Fremd-DNA in der Zelle exprimiert wird. Das Virus ist dadurch gekennzeichnet, daß es ein Adenovirus und der Ligand Transferrin ist.

Es wurde überraschend festgestellt, daß mittels Transferrin-modifiziertem Adenovirus Fremd-DNA in Blutzellen, die der Aufnahme von nicht-modifiziertem Adenovirus nicht zugänglich sind, internalisiert und effizient zur Expression gebracht wird. Bei der Infektion einer Zelle durch ein Virus läuft eine Reihe komplexer Vorgänge ab, die bei den verschiedenen Viren unterschiedlichen Strategien folgen. Da am produktiven Eintritt eines Virus zahlreiche Ereignisse beteiligt sind, die mit der Bindung des Virus an seinen Rezeptor in Zusammenhang stehen, wobei z.B. eine Konformationsänderung, die das Virus bei der Bindung an seinen Rezeptor erfährt, eine für den Ablauf der Internalisierung und Replikation unabdingbare Voraussetzung sein kann, konnte nicht vorausgesagt werden, ob der Zusammenhang der für die Infektion erforderlichen Ereignisse erhalten bleibt, wenn am Virus Modifikationen vorgenommen wurden.

Der Eintritt von Transferrin-modifiziertem Adenovirus über den Transferrinrezeptor (B) im Vergleich zum Eintritt des nicht-modifizierten Virus (A) über seinen Rezeptor ist schematisch in Fig. 1 dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Transferrin-modifizierten Adenoviren können verwendet werden, um in trans die Aufnahme von Transferrin-Polylysin/DNA-Komplexen in

Zellen zu verbessern, die Transferrin-Rezeptoren, aber keine oder nicht genügend Adenovirus-Rezeptoren aufweisen. Bei der Anwendung *in trans* wird das modifizierte Adenovirus gemeinsam mit Transferrin-Polylysin/DNA-Komplexen auf die zu transfizierenden Zellen aufgebracht, um zusammen mit den DNA-Komplexen in die Zelle aufgenommen zu werden und aufgrund seiner endosomolytischen Fähigkeit die Freisetzung der DNA-Komplexe aus den Endosomen zu bewirken (Curiel et al. 1991).

Das modifizierte Adenovirus kann auch verwendet werden, um als Bestandteil von ternären oder Kombinationskomplexen (Zatloukal et al., 1992) die Effizienz dieser Komplexe zu steigern. Zu diesem Zweck wird das erfindungsgemäße Transferrin-modifizierte Virus, beispielsweise durch eine Biotin-Streptavidin-Brücke, mit einem Polylysin/DNA-Komplex verbunden, wobei gegebenenfalls auch das Polylysin mit Transferrin konjugiert ist. Durch das an das Adenovirus gekoppelte Transferrin übernimmt in diesem Fall das Virus bei Zellen, die Transferrin-Rezeptoren haben, zusätzlich zu seiner endosomolytischen Funktion die Funktion eines Internalisierungsfaktors für den Kombinationskomplex.

Die erfindungsgemäßen Adenovirus-Konjugate können in sämtlichen Anwendungen, in denen Adenoviren eine Steigerung des Gentransfers bewirken, zum Einsatz kommen (Curiel et al., 1991; Curiel et al., 1992a; Zatloukal et al., 1992; Cotten et al., 1992; Wagner et al., 1992; Curiel et al., 1992b; Yoshimura et al., 1993).

In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Adenovirus ein rekombinantes Adenovirus, d.h. ein Adenovirus, das in seinem Genom mittels rekombinanter

Methoden integrierte Fremdsequenzen enthält. Dabei sind vor allem Sequenzen von Interesse, deren Expression in der Zielzelle einen erwünschten biologischen Effekt erzielt, z. B. DNA, die ein defektes Gen ersetzt. In dieser Ausführungsform bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, den limitierten Tropismus, den die ansonsten erfolgreiche Verwendung rekombinanter Adenoviren für die Gentherapie aufweist, zu beseitigen und das System breiter anwendbar zu machen.

Für die erfindungsgemäßen Virus-Konjugate besteht keinerlei Beschränkung hinsichtlich der Adenoviruskomponente, sämtliche Adenoviren, die an ihrer Oberfläche eine zur Bindung an Transferrin fähige Gruppierung aufweisen, sind geeignet, z.B. die von Berkner, 1988; Stratford-Perricaudet et al., 1990; Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1992, beschriebenen Adenoviren, die als Vektoren für den Import von DNA in die menschliche Zelle, insbesondere für die gentherapeutische Anwendung, vorgeschlagen wurden, können modifiziert werden, um DNA selektiv in vivo oder ex vivo in die Zielzelle zu befördern.

Im Hinblick auf die Anwendung im Menschen wird als Transferrin-Komponente insbesondere Humantransferrin verwendet. Transferrin ist ein Eisentransportprotein, das mit hoher Effizienz über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird, wodurch es als Transport-Vehikel bereits für verschiedene Anwendungen benutzt wurde, z.B. um in Form verschiedener Konjugate Toxine, niedermolekulare Substanzen oder Gene in die Zelle zu transportieren. Der Vorgang, der bei der Internalisierung von Transferrin durch seinen Rezeptor abläuft, unterscheidet sich von anderen Ligand/Rezeptor-Paarungen u.a. dadurch, daß der

Transferrinrezeptor mit hohem Durchsatz rezykliert wird.

Bezüglich der Fremd-DNA bestehen keinerlei durch die vorliegende Erfindung bedingten Beschränkungen; die DNA kann ein beliebiges Gen sein oder auch ein Plasmid-Konstrukt, das z.B. für inhibierende RNA kodierende Elemente enthält. Gentherapeutisch wirksame Sequenzen sind dem Fachmann bekannt; Beispiele für derzeit als für therapeutisch aussichtsreich angesehene Sequenzen sind u.a. der Übersicht von Anderson, 1992, entnehmbar.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zum Einbringen von Fremd-DNA in menschliche Zellen, die keine oder nur eine geringe Zahl von Adenovirus-Rezeptoren aufweisen oder deren Adenovirus-Rezeptoren ganz oder teilweise blockiert sind, in welchem man die Zellen mit dem erfindungsgemäßen Virus in geeigneter Formulierung ex vivo oder in vivo behandelt.

Insbesondere sind die Zellen Blutzellen.

Die Anforderungen an die Formulierung, in der die erfindungsgemäßen modifizierten Viren verabreicht werden, werden durch die spezielle Anwendung definiert; der Fachmann kann einschlägigen pharmazeutischen Handbüchern (z.B. Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980) zahlreiche Träger- und Zusatzstoffe entnehmen, die für die Formulierung verwendet werden, wesentlich ist vor allem, daß die Formulierung die Transport-Funktion des erfindungsgemäßen Virus-Transferrin-Konjugats sowie die Bioverfügbarkeit des in der Zelle exprimierten Proteins nicht beeinträchtigen.

Das Virus kann an Transferrin in für die Kopplung von Peptiden an sich bekannter Weise erfolgen, vorzugsweise erfolgt die Bindung des Adenovirus an Transferrin über die Kohlenhydratseitenketten des Transferrins. Dieser Typ Bindung ist in der DE-A1 41 150 38, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird, für Transferrin-Polylysin-Konjugate beschrieben.

Es wurde überraschend festgestellt, daß sich diese Art der Bindung sehr gut zur Modifikation von Adenoviren mit Transferrin eignet, um Fremd-DNA in Zellen zu importieren, die ansonsten dem Transportvehikel Adenovirus nicht bzw. nicht ausreichend zugänglich sind.

Voraussetzung für die Fähigkeit des Virus, an die Kohlenhydratseitenketten des Transferrins zu koppeln, ist das Vorliegen von Aminogruppen an der Oberfläche des Virus. Ohne auf diese Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte es dabei von Vorteil sein, daß die Kohlenhydratseitenkette des Transferrins einen natürlichen Abstandhalter zwischen Transferrin und dem Virus darstellt. Dadurch dürfte einerseits die Bindungs- und Internalisierungsfähigkeit des Transferrins, andererseits dürfte, was für die Anwendung der erfindungsgemäßen Konjugate als Bestandteil von Kombinationskomplexen von Bedeutung ist, die endosomolytische Aktivität des Adenovirus erhalten bleiben.

Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Adenovirus-Transferrin-Konjugate, das ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, besteht darin, Transferrin unter schonenden Bedingungen zu einer im Kohlenhydratanteil Aldehydgruppen enthaltenden Form zu oxidieren und das oxidierte

Transferrin unter reduzierenden Bedingungen mit dem Adenovirus zu koppeln.

Für den Oxidationsschritt, bei dem terminale Sialinsäuren der Kohlenhydratketten des Transferrins zur Aldehydform oxidiert werden, wird als Oxidationsmittel bevorzugt Perjodat, insbesondere Natriumperjodat, eingesetzt.

Als Substanzen zur Schaffung reduzierender Bedingungen bei der Kopplung der Aldehydform des Transferrins mit dem Adenovirus sind Reduktionsmittel geeignet, die unter schonenden Bedingungen Schiff'sche Basen selektiv reduzieren. Bevorzugt für den Einsatz als Reduktionsmittel im erfindungsgemäßen Verfahren sind Natriumcyanoborhydrid oder tertiäres Butylaminboran.

Das Verfahren wird bevorzugt bei niedrigen Temperaturen, insbesondere 0°C bis Raumtemperatur, durchgeführt.

Die Mechanismen der einzelnen Reaktionsstufen sind dem Durchschnittsfachmann geläufig; es liegt daher im Rahmen seiner Fähigkeiten, die Bedingungen für die einzelnen Verfahrensschritte den jeweiligen individuellen Bedürfnissen anzupassen. In einzelnen Anwendungsfällen kann es erstrebenswert sein, das Viruspartikel mit einer geringeren Anzahl von Transferrinmolekülen auszustatten als in den im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuchen, um ein optimales Gleichgewicht zwischen Internalisierungs- und endosomolytischer Eigenschaft zu erhalten. Modifizierte Adenoviruspartikel mit unterschiedlichen Anteilen von daran gebundenem Transferrin können erhalten werden, indem das Verhältnis Adenovirus/Reagentien empirisch verändert wird.

Figurenübersicht:

- Fig. 1: Schematische Darstellung des Viruseintritts in die Zelle. A: Nicht-modifiziertes Adenovirus. B: Transferrin-modifiziertes Adenovirus.
- Fig. 2: Quantifizierung des an Adenovirus gebundenen Transferrin auf Nitrozellulosemembranblot
- Fig. 3: Expression von β -Galaktosidase in K562-Zellen nach Transfektion mit rekombinantem Adenovirus. A: Nicht-modifiziertes Adenovirus. B: Transferrin-modifiziertes Adenovirus. C: Kontrolle (nicht-infizierte Zellen).
- Fig. 4: Quantitativer Vergleich mittels Luminometrie des Gentransfers in K562-Zellen

Die Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels illustriert:

Beispiel

a) Adenoviruspräparation

5×10^6 293-Zellen (ATCC No. 1573; Graham et al., 1977) wurden in 175 cm² Flaschen mit 60 ml DMEM Medium plus 10 % FCS und 1 % Glutamin sowie einem Antibiotikazusatz (Penicillin, Streptomycin) 3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ gezüchtet, bis ca. 2×10^7 Zellen, die zu ca. 80 - 100 % konfluent waren, erhalten wurden. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Adenovirus Ad.RSV β gal (E1-, E3-defektes Adenovirus Typ 5, das das E.coli β -Galaktosidasegen unter Kontrolle des RSV Promotor/Enhancers trägt; Stratford-Perricaudet et al.,

1992) infiziert (ca. 2×10^9 Partikel in 5 ml Medium mit 2 % FCS). Nach ca. 2 Tagen Inkubation bei 37°C waren die Zellen angeschwollen und hatten sich nahezu vollständig vom Boden abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen 10 min in einem Sorvall GSA Rotor bei 3.000 rpm zentrifugiert, die Zellpellets mit PBS in ein 50 ml Röhrchen transferiert und 10 min in einer Heraeus Zentrifuge bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im 2- bis 3fachen Volumen 10 mM HEPES/1 mM EDTA (HE) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Für den Zellaufschluß wurden die Zellen vier Frier-/Tauzyklen (flüssiger Stickstoff/37°C Wasserbad) unterworfen und 10 min zentrifugiert (Heraeus, 4.000 rpm). Anschließend wurde das Zelllysate einer Ultrazentrifugation unterworfen (vTI-50 47.000 rpm/1 h/20°C; CsCl Dichtegradient: 20 ml 1.33 g/cm³ CsCl in HE, unterschichtet mit 10 ml 1.45 g/cm³ CsCl in HE, überschichtet mit 10 ml Zelllysate). Die opaleszente Virusbande wurde gesammelt und einer zweiten Ultrazentrifugation unterworfen (vTI-50 63.000 rpm/4 h/20°C; CsCl Gleichgewichtsgradient: 2.5 ml 1.33 g/cm³ CsCl in HE, gemischt mit 2.5 ml Virusbande). Pro Zellkulturflasche wurden $1 - 3 \times 10^{11}$ Viruspartikel erhalten, die mit 40 % (v/v) Glycerin bei -70°C gelagert wurden. Die Bestimmung der Virionkonzentration wurde über den Proteingehalt mittels Bradfordassay (BSA, Fraktion V, BMB als Standard) bestimmt, wobei das Verhältnis 1 mg/ml Virusprotein = 1.34×10^{12} Viruspartikel (Lemay et al., 1980) herangezogen wurde.

b) Modifikation des Adenovirus mit Transferrin

Eine Lösung von 105 mg (1.30 µmol) Transferrin (human, Sigma) in 1 ml 30 mM Natriumacetatpuffer (pH 5) wurde

einer Gelfiltration auf einer Sephadex G-25 PD10 Säule (Pharmacia) unterworfen, wobei derselbe Puffer verwendet wurde. Die erhaltenen 2 ml Lösung, die 80 mg (1.0 μmol) Transferrin enthielten (der Transferringegehalt wurde durch UV-Messung bei 280 nm und Ninhydrinassay bestimmt), wurden in einem Speedvac (Savant) auf 1 ml konzentriert, auf 0°C gekühlt und mit 50 μl 30 mM Natriumacetatpuffer (pH 5), enthaltend 1.1 mg (5 μmol) Natriumperjodat, behandelt. Die Mischung wurde in einem Eisbad im Dunklen 90 min lang stehen gelassen. Anschließend wurde eine weitere Gelfiltration (Sephadex G-25 PD10 Säule, Pharmacia, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.3) durchgeführt, dabei wurden 1 ml einer Lösung, enthaltend 66 mg (0.82 μmol) oxidiertes Transferrin erhalten (der Gehalt an oxidiertem, Aldehyd enthaltender Form von Transferrin wurde bestimmt mittels Färbung mit Anisaldehydeagens, wie von Wagner et al., 1991, beschrieben). Ein Teil der modifizierten Transferrinlösung (0.6 ml; 0.5 μmol) wurde rasch zu einer Lösung, enthaltend 25 μg (bezogen auf Protein) Adenovirus in 300 μl HBS, hinzugefügt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung von 1 mg (15 μmol) Natriumcyanborhydrid zugegeben. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde das Transferrin-konjugierte Adenovirus von überschüssigem freiem Transferrin gereinigt, indem das Virus mit einem gleichen Volumen HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4) verdünnt und das Material über einen CsCl-Stufengradienten zentrifugiert wurde. Ca. 1.5 ml des modifizierten Virus wurden in einem vTI-65 Röhrchen (Beckman) mit 3 ml 1.31 g/cm³ CsCl und 1 ml 1.45 g/cm³ CsCl (beide CsCl-Lösungen in 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 7.4) unterschichtet. Die Probe wurde 1 h lang bei 63.000 rpm in einem vTI-65 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die opaleszente Virusbande wurde geerntet, mit einem gleichen Volumen HBS verdünnt und einer zweiten identischen CsCl-

Gradientenreinigung unterworfen. Alternativ wurde die erste Virusbande mit 1.33 g/cm^3 CsCl, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4, auf 5.5 ml gebracht und die Probe bis zum Gleichgewicht zentrifugiert (4 h, 63.000 rpm, vTi-65 Rotor). Das gereinigte modifizierte Virus wurde geerntet, mit einem gleichen Volumen von 96 % Glycerin (Fluka) verdünnt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Parallel wurde eine Kopplung mit eisenfreiem Transferrin durchgeführt; das gereinigte Virus wurde mit $1 \mu\text{l}$ 1 mM Eisen (III) Citratpuffer, pH 7.5 versetzt.

c) Quantitative Bestimmung des an Adenovirus gebundenen Transferrins

Serienverdünnungen von Transferrin-modifiziertem Adenovirus, nicht-modifiziertem Adenovirus sowie Transferrin-Standards (jeweils in HBS; die Anzahl der aufgetragenen Viruspartikel bzw. Transferrinmoleküle ist Fig. 2 entnehmbar) wurden an eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, 0.1 mm Porengröße) gebunden. Der Blot wurde über Nacht bei 4°C mit 3 % (w/v) pulverisierter Magermilch in HBS (10 ml) vorhybridisiert. Der Transferringehalt jeder Probe wurde bestimmt, indem die Membran 4 h bei Raumtemperatur einem Mausantikörper, der humanes Transferrin erkennt (Chemicon MAB 033-19/1, Verdünnung 1:2000 in HBS/Milch, 10 ml), und im Anschluß daran (nach 2 stündigem Waschen mit $4 \times 130 \text{ ml}$ HBS/Milch) 1 h lang einem ^{125}I -markiertem zweiten Antikörper (Schaf-anti-Maus-Ig, Amersham, Kat.No. L52215, $2 \mu\text{Ci}$, in 20 ml HBS/Milch) exponiert wurde. Die Phosphorimager-Analyse der Membran zeigt die Gegenwart von Transferrin in den Proben mit modifiziertem Adenovirus, jedoch kein Signal beim nicht-modifizierten Adenovirus. Der Vergleich der mit den modifizierten Virus erhaltenen Signale mit den

Transferrinstandards erlaubt eine Bestimmung der Menge an Transferrin, die an ein Virusteilchen gebunden ist. Es wurde gefunden, daß 3×10^9 Viruspartikel ein Signal geben, das mit dem von 4×10^{12} Transferrinmolekülen vergleichbar ist. Daraus ergibt sich, daß an ein Adenovirusteilchen ca. 1.000 Transferrinmoleküle gebunden sind. Die Assoziation der Transferrinmoleküle mit Adenovirusteilchen durch zwei CsCl-Dichtegradienten spricht für eine kovalente Bindung zwischen Kapsidproteinen des Virus und dem Transferrinmolekül. Damit in Einklang ist auch das Ergebnis einer Analyse von Viruskapsidproteinen mittels SDS-PAGE, die zeigte, daß die Hauptmenge des gekoppelten Transferrins an das Hexon gebunden ist.

- d) Transfektion von K562-Zellen mit Transferrin-modifiziertem rekombinantem Adenovirus, enthaltend als Fremd-DNA das β -Galaktosidasegen

K562-Zellen (ATCC No. CCL 243) wurden in Suspension in RPMI 1640 Medium (Gibco BRL) plus 10 % FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin gezüchtet. 20 h vor der Transfektion wurden die Zellen in frisches Medium, enthaltend zwecks Erhöhung ihrer Transferrinrezeptor-Zahl 50 μ M Deferrioxamin (Cotten et al., 1990), überführt. Die Transfektionen wurden bei einer Dichte von 250.000 Zellen/ml in demselben Medium (plus 50 μ M Deferrioxamin) durchgeführt. Es wurden jeweils gleiche Mengen (3.000 Viruspartikel/Zelle bis 300 Viruspartikel/Zelle) von entweder nicht-modifiziertem Adenovirus (Ad.RSVBgal) oder von modifiziertem Adenovirus (Tf-Ad.RSVBgal) auf die K562-Zellen aufgebracht. 48 h nach der Transfektion wurden ca. 25.000 Zellen in einem Volumen von 100 bis 200 μ l in die Vertiefungen einer rundbödigen 96-Well-Platte

überführt und bei 800 rpm in einem Beckman GH 3.7 Rotor 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und mit 100 µl 0.5 % Glutardialdehyd in HBS ersetzt. Die Zellen wurden durch Pipettieren dispergiert und dann wieder zentrifugiert. Daraufhin wurde das Fixiermittel entfernt und die Zellen gewaschen. Anschließend wurde mit 200 µl Färbelösung (10 mM Phosphatpuffer pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3.3 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 3.3 mM K₃Fe(CN)₆ und 0.2 % 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galaktopyranosid) bei 37 °C 20 min bis 3 h inkubiert (Lim und Chae, 1989). Die Zellen wurden bei 38°C 5 h lang inkubiert, dann 2 x gewaschen und nach dem Transfer in flachbödige Vertiefungen einer 96-Well-Platte photographiert.

Das Ergebnis der Transfektionen ist in Fig. 3 wiedergegeben: Es wurde gefunden, daß beim höchsten Virus/Zellverhältnis das nicht-modifizierte Virus die Zellen mit einer Leistungsfähigkeit von ca. 5 % transduzieren kann. Beim selben Virus/Zellverhältnis transduziert jedoch das Transferrin-modifizierte Virus mehr als 90 % der Zellpopulation, wobei auch die tatsächlichen Mengen an pro Zelle produzierter β-Galaktosidase höher sind. Kontrollversuche zeigten, daß sowohl nicht-modifiziertes als auch Transferrin-modifiziertes Adenovirus in HeLa-Zellen mit gleicher Leistungsfähigkeit eindringen konnte.

Zusätzlich wurde eine Analyse der β-Galaktosidase-Aktivität mittels Luminometrie nach der von Jain und Magratz, 1991, beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden K562-Zellen 18 h lang in RPMI/10 % FCS, enthaltend 50 µM Deferrioxamin gezüchtet. Unmittelbar vor der Infektion wurden die Zellen in frisches Deferrioxamin enthaltendes Medium gegeben (250.000 Zellen/ml, 50.000 Zellen pro Vertiefung einer Platte

mit 96 Vertiefungen). Die Verdünnungen der Kontrollen und der Proben mit Transferrin-modifiziertem Adenovirus Ad.RSVBgal wurden in RPMI/2 % hitzeinaktiviertem Pferdeserum hergestellt und Aliquots des Virus (50 µl), die die in der Fig. 4 angegebenen Anzahl an Viruspartikeln pro Zelle enthielten, auf die Zellen aufgegeben. Nach 4 h bei 37°C wurden die Zellen in frischem Medium (ohne Deferrioxamin) gewaschen. Nach 24 h bei 37°C wurden Aliquots von 50.000 infizierten oder Kontrollzellen zur luminometrischen Messung mittels Zentrifugation gesammelt, in 100 µl 0.25 M Tris pH 7.5 aufgenommen und durch drei Frier/Auftauzyklen (flüssiger Stickstoff/37°C) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren entfernt (14.000 x g, Eppendorf), und Aliquots des Überstandes, auf Proteingehalt standardisiert, wurden unter Verwendung des chemilumineszierenden Substrats AMPGD und einem Emerald Lumineszenzverstärker (Tropix) analysiert. Das Ergebnis der Messungen ist in Fig. 4 dargestellt.

Literatur

- Anderson, F.W. , 1992, *Science* 256, 808.
- Berkner, K.L., 1988, *BioTechniques* 6, 616-629.
- Cotten, M., Wagner, E., Zatloukal, K., Phillips, S.,
Curiel, D.T. und Birnstiel, M.L., 1992,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89, 6094-6098.
- Cotten, M., Laengle-Rouault, F., Kirlappos, H.,
Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H., und
Birnstiel, M.L., 1990, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87,
4033-4037.
- Curiel, D.T., Agarwal, S., Wagner, E. und Cotten, M.,
1991, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 8850-8854.
- Curiel, D.T., Agarwal, S., Romer, M.U., Wagner, E.,
Cotten, M., Birnstiel, M.L. und Boucher, R.C.,
1992a, *Am.J.Respir.Cell and Mol.Biol.* 6, 247-252.
- Curiel, D.T., Wagner, E., Cotten, M., Birnstiel, M.L.,
Agarwal, S., Li, Ch.-M., Loechel, S. und Hu, P.-
H., 1992b, *Human Gene Therapie* 3, 147-154.
- Goud, B., Legrain, P. und Buttin, G., 1988, *Virology*
163, 251-254.
- Graham, F., Smiley, J., Russel, W.C. und Nairu, R.,
1977, *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- Horvath, J. und Weber, J., 1988, *J. Virol.* 62, 341-345.
- Jain, V.K. und Magrath, I.T., 1992, *Anal. Biochem.* 199,
119-124.
- Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K.,
Culver, K., Freeman, S., Director, E., Lotze,
M.T., Blaese, R.M., Anderson, W.F. und Rosenberg,
S.A., 1990, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 473-477.
- Lemay, P., Boudin, M., Milleville, M. und Boulanger,
P., 1980, *Virology* 101, 131-143.
- Lim, K. und Chae, C.B., 1989, *BioTechniques* 7, 576-579.
- Rosenfeld, M.A., Siegfried, W., Yoshimura, K.,
Yoneyama, K., Fukayama, M., Stier, L.E., Paakko,
P.K., Gilardi, P., Stratford-Perricaudet, L.D.,

- Perricaudet, M. et al., 1991, Science 252, 431-434.
- Rosenfeld, M.A., Yoshimura, K., Trapnell, B., Yoneyama, K., Rosenthal, E., Dalemans, W., Fukayama, M., Bargon, J., Stier, L., Stratford-Perricaudet, L.D. et al., 1992, Cell 68, 143-155.
- Roux, P., Jeanteur, P. und Piechaczyk, M., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86, 9079-9083.
- Stratford-Perricaudet, L., Levrero, M., Chasse, J.-F., Perricaudet, M. und Briand, P., 1990, Hum. Gene Ther. 1, 241-256.
- Stratford-Perricaudet, L., Makeh, I., Perricaudet, M. und Briand, P., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630.
- Wagner, E., Cotten, M., Mechtler, K., Kirlappos, H. und Birnstiel, M.L., 1991, Bioconjugate Chemistry 2, 226-231.
- Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, D.T. und Birnstiel, M.L., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89, 6099-6103.
- Wilson, J.M., Danos, O., Grossman, M., Raulet, D.H. und Mulligan, R.C., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87, 439-443.
- Yoshimura, K., Rosenfeld, M.A., Seth, P. und Crystal, R.G., 1993, J. Biol. Chem. 268, 2300-2303.
- Zatloukal, K., Wagner, E., Cotten, M., Phillips, S., Plank, C., Steinlein, P., Curiel, D. und Birnstiel, M.L., 1992, Ann.New York Acad.Sci. 660, 136-153.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, Mack Publ. Co., Easton, PA, Osol (ed.).

Patentansprüche

1. Virus für den Transport von Fremd-DNA in höhere eukaryotische Zellen, dessen Oberfläche mit einem Liganden für einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle derart modifiziert ist, daß es an die Zelle bindet und derart internalisiert wird, daß die Fremd-DNA in der Zelle exprimiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus und der Ligand Transferrin ist.
2. Modifiziertes Adenovirus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus und das Transferrin über die Kohlenhydratseitenketten des Transferrins miteinander verbunden sind.
3. Modifiziertes Virus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus vom Typ 2 ist.
4. Modifiziertes Virus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus vom Typ 5 ist.
5. Modifiziertes Virus nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein rekombinantes Adenovirus ist, das als Fremd-DNA eine gentherapeutisch wirksame DNA-Sequenz enthält.
6. Modifiziertes Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Transferrin Humantransferrin ist.
7. Verfahren zur Herstellung von Adenovirus-Transferrin-Konjugaten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Transferrin unter

schonenden Bedingungen zu einer im Kohlenhydratanteil Aldehydgruppen enthaltenden Form oxidiert und das oxidierte Transferrin unter reduzierenden Bedingungen mit dem Adenovirus koppelt.

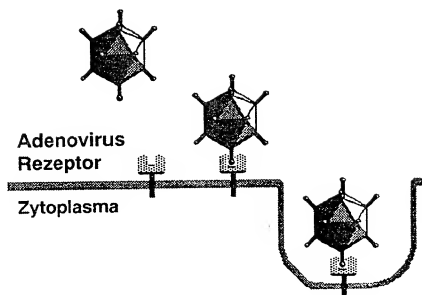
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man das Transferrin mit Periodat oxidiert.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kopplung unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart einer Substanz durchführt, die unter für das Transferrin schonenden Bedingungen Schiff'sche Basen selektiv reduziert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kopplung in Gegenwart von Natriumcyanoborhydrid vornimmt.
11. Verfahren zum Einführen von Fremd-DNA mittels humanem Adenovirus in humane Zellen, die keine oder nur eine geringe Zahl von Adenovirus-Rezeptoren aufweisen oder deren Adenovirus-Rezeptoren ganz oder teilweise blockiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem in den Ansprüchen 5 und 6 definierten Virus in Berührung bringt.
12. Verfahren zum Einführen von Fremd-DNA mittels humanem Adenovirus in humane Zellen, die keine oder nur eine geringe Zahl von Adenovirus-Rezeptoren aufweisen oder deren Adenovirus-Rezeptoren ganz oder teilweise blockiert sind, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen mit einem in einem der Ansprüche 1 bis 4 und 6

definierten Virus als Bestandteil eines Komplexes in Berührung bringt, in welchem Polylysin mit dem Virus sowie gegebenenfalls zusätzlich mit Transferrin konjugiert sowie mit der Fremd-DNA komplexiert ist.

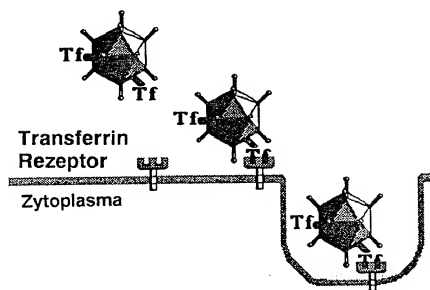
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Blutzellen sind.

1/4
Fig. 1

A.

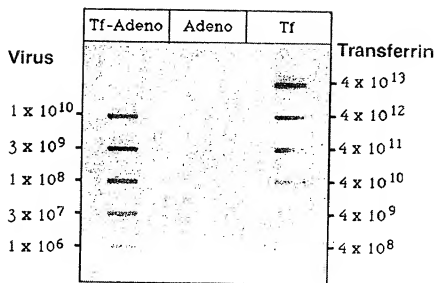


B.



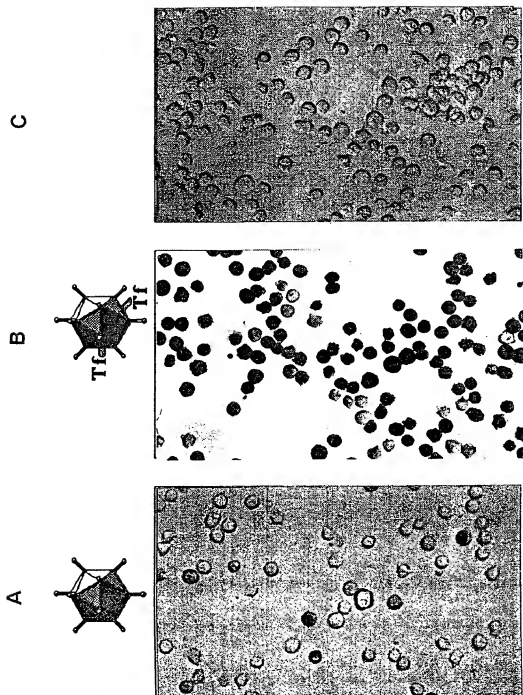
2/4

Fig. 2



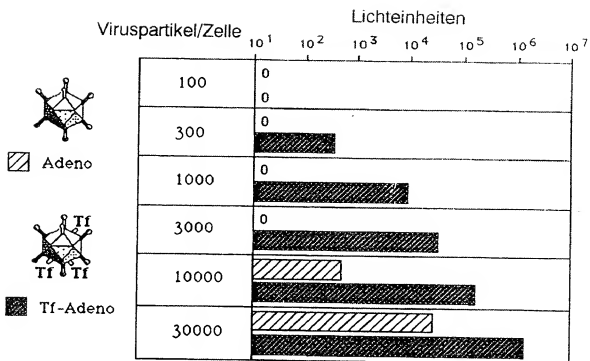
3/4

Fig. 3



4/4

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/EP 94/01065A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/87 C12N15/86 C12N7/04 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO,A,94 10323 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD) 11 May 1994 see page 10, line 16 - line 17; claims ---	1,4,5,11
Y	WO,A,92 06180 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 16 April 1992 see the whole document --- -/--	1-6, 11-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 1994

Date of mailing of the international search report

- 4. 08. 94

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambronnet, F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89, no. 13, July 1992, WASHINGTON US pages 6099 - 6103 WAGNER, E. ET AL. 'Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes' see the whole document ----	1-6, 11-13
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 88, no. 19, October 1991, WASHINGTON US pages 8850 - 8854 CURIEL, D.T. ET AL. 'Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery' cited in the application see the whole document ----	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,93 07283 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH & UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 15 April 1993 see the whole document ----	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,93 09221 (THERAGENE HB) 13 May 1993 see the whole document ----	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,94 06923 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 31 March 1994 see the whole document -----	1-6, 11-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/EP 94/01065

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9410323	11-05-94	NONE	
WO-A-9206180	16-04-92	AU-A- 8860391 CA-A- 2092323 EP-A- 0553235	28-04-92 02-04-92 04-08-93
WO-A-9307283	15-04-93	AU-A- 2652692 CA-A- 2118816 EP-A- 0545016 FI-A- 941474	03-05-93 31-03-93 09-06-93 30-03-94
WO-A-9309221	13-05-93	SE-A- 9103183	01-05-93
WO-A-9406923	31-03-94	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Bd. 89, Nr. 13, Juli 1992, WASHINGTON US Seiten 6099 - 6103 WAGNER, E. ET AL. 'Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes' siehe das ganze Dokument ---	1-6, 11-13
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Bd. 88, Nr. 19, Oktober 1991, WASHINGTON US Seiten 8850 - 8854 CURIEL, D.T. ET AL. 'Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,93 07283 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH & UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 15. April 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,93 09221 (THERAGENE HB) 13. Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-6, 11-13
P,Y	WO,A,94 06923 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 31. März 1994 siehe das ganze Dokument -----	1-6, 11-13

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9410323	11-05-94	KEINE	
WO-A-9206180	16-04-92	AU-A- 8860391	28-04-92
		CA-A- 2092323	02-04-92
		EP-A- 0553235	04-08-93
WO-A-9307283	15-04-93	AU-A- 2652692	03-05-93
		CA-A- 2118816	31-03-93
		EP-A- 0545016	09-06-93
		FI-A- 941474	30-03-94
WO-A-9309221	13-05-93	SE-A- 9103183	01-05-93
WO-A-9406923	31-03-94	KEINE	

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)